

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Anita Perešin

ENZIMATSKA SINTEZA 6-CIJANO-4-KETOHEKSAN KISELINE

DIPLOMSKI RAD

Voditelj rada: izv. prof. dr. sc. Zvezdana Findrik Blažević

Članovi ispitnog povjerenstva:

izv. prof. dr. sc. Zvezdana Findrik Blažević

dr. sc. Martina Sudar, zn. suradnica

izv. prof. dr. sc. Marija Vuković Domanovac

Zagreb, 3. srpanj 2017.



This project has received funding from the European Union's Horizon 2020 Research and Innovation Programme under Grant Agreement No 635595

Zahvale

Veliko hvala dr. sc. Martini Sudar na strpljenju, potpori, brojnim savjetima i uloženom vremenu tijekom provođenja eksperimenata i pisanja diplomskog rada.

Hvala izv. prof. dr. sc. Zvezdani Findrik Blažević na pruženoj pomoći i savjetima tijekom pisanja diplomskog rada.

Od srca hvala mojim roditeljima i sestri, te dečku i prijateljima na bezuvjetnoj pomoći i podršci.

SAŽETAK

U ovom radu provedena je enzimska reakcija katalizirana enzimom sintaza 2-sukcinil-5-enolpiruvil-6-hidroksi-3-cikloheksen-1-karboksilne kiseline (MenD) s α -ketoglutaratom kao donorskim supstratom i akrilonitrilom kao akceptorskim supstratom, uz tiamin difosfat kao koenzim i magnezijev ion kao kofaktor. Reakcija je provedena u kotlastom reaktoru tijekom koje je praćena i aktivnost enzima.

Osim toga proveden je i ponovljivi šaržni eksperiment. U ovom eksperimentu mjerena je koncentracija supstrata i produkta, te aktivnost enzima tijekom 72 sata. Nakon 24 i 48 sati u reaktor su dodani supstrati: α -ketoglutarat i akrilonitril kako bi se postigli isti početni uvjeti kao na početku reakcije.

Također su provedeni i eksperimenti u kojima je ispitan utjecaj koncentracije akrilonitrila tijekom inkubacije na deaktivaciju enzima.

Rezultati pokazuju da se tijekom provedbe reakcije smanjuje aktivnost enzima. U eksperimentima u kojima je praćen utjecaj koncentracije akrilonitrila na deaktivaciju enzima, rezultati pokazuju da se povećanjem koncentracije akrilonitrila smanjuje aktivnost enzima.

Ključne riječi: MenD, Stetter reakcije, akrilonitril, α -ketoglutarat, kotlasti reaktor

ABSTRACT

In this work, an enzymatic reaction catalyzed by 2-succinyl-5-enolpyruvyl-6-hydroxy-3-cyclohexene-1-carboxylic acid synthase (MenD) with α -ketoglutarate as donor substrate and acrylonitrile as acceptor substrate with thiamine diphosphate as coenzyme and magnesium ion as a cofactor was carried out. The reaction was carried out in a batch reactor during which the enzyme activity was monitored.

In addition, a repetitive batch experiment was carried out. In this experiment, substrate and product concentration and enzyme activity were measured over 72 hours. After 24 and 48 hours fresh substrates α -ketoglutarate and acrylonitrile were added to achieve the same initial conditions as at the beginning of the reaction but without the addition of the enzyme.

Also, the influence of acrylonitrile concentration during incubation on enzyme deactivation was investigated.

The results show that during the reaction enzyme activity decreases. The influence of acrylonitrile concentration on enzyme deactivation show that increasing the concentration of acrylonitrile reduces enzyme activity.

Key words: MenD, Stetter reaction, acrylonitrile, α -ketoglutarate, batch reactor.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. OPĆI DIO.....	2
2.1. Enzimi ili biokatalizatori.....	2
2.2. Struktura enzima	3
2.3. Stabilnost enzima	5
2.4. Izolacija enzima.....	6
2.5. Liaze	7
2.5.1. Sintaza 2-sukcinil-5-enolpiruvil-6-hidroksi-3-cikloheksen-1-karboksilne kiseline (MenD).....	8
2.6. Enzimski kinetika	10
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	12
3.1. Aparatura.....	12
3.1.1. Tekućinska kromatografija visokog učinka (HPLC)	12
3.1.2. Spektrofotometar	12
3.1.3. Eppendorf tresilica	13
3.1.4. Analitička vaga.....	13
3.1.5. Homogenizator	13
3.2. Materijali	14
3.3. HPLC metode.....	14
3.4. Mjerenje aktivnosti enzima MenD	15
3.5. Provođenje reakcije između akrilonitrila i α -ketoglutarata katalizirane enzimom MenD u kotlastom reaktoru.....	16
3.6. Ponovljivi eksperiment u kotlastom reaktoru.....	16
3.7. Utjecaj koncentracije akrilonitrila na deaktivaciju enzima MenD.....	17
4. MATEMATIČKI MODEL	18
5. REZULTATI I RASPRAVA	19
5.1. Reakcije između akrilonitrila i α -ketoglutarata katalizirane enzimom MenD u kotlastom reaktoru.....	19
5.2. Provođenje ponovljivog eksperimenta	20
5.3. Utjecaj koncentracije akrilonitrila na deaktivaciju enzima MenD.....	22
6. ZAKLJUČAK	29

7. LITERATURA.....	30
8. POPIS SIMBOLA I OZNAKA.....	33
9. PRILOZI.....	35
ŽIVOTOPIS	38

1. Uvod

Stvaranje produkata dodane vrijednosti putem kemijskih transformacija značajno je doprinijelo kvaliteti života u zadnjih nekoliko stoljeća, a globalne potrebe za čistim proizvodnim tehnologijama, sirovinama i upravljanjem otpadom i opasnim kemikalijama predstavljaju izazov za kemiju i biotehnologiju.¹ Katalizatori se uvelike koriste i razvijaju za potrebe u farmaceutskoj industriji, no koriste se i u ostalim granama industrije i vrlo su bitni za današnje gospodarstvo i društvo.²

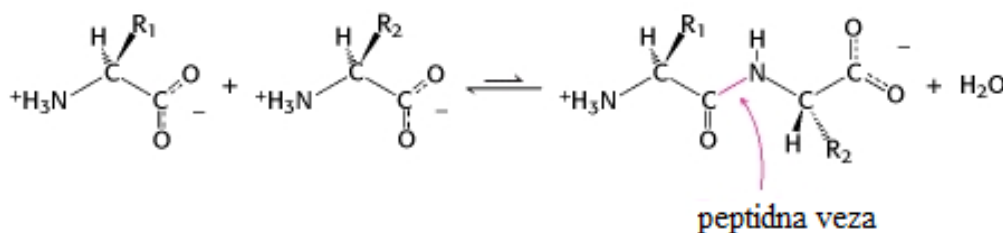
Mnogi katalizatori korišteni u automobilske industriji, preradi goriva i kemijske industriji sastoje se od anorganskih, organometalnih ili organskih spojeva u heterogenom obliku, a danas se sve više upotrebljavaju biokatalizatori. Upotreba biokatalizatora je sve više zastupljena zbog veće sigurnosti, zdravlja, ekonomičnih načina uštede energije, te ekološki prihvatljivih produkata procesa.¹ Kemijski oksidansi neselektivno oksidiraju sve tvari u otopini, dok biokatalizator oksidira isključivo ono što odgovara njegovom aktivnom mjestu, što je opet određeno tipom spoja, odnosno njegovom karakterističnom skupinom.³ Dobivanje molekularnih kompleksa iz jednostavnih početnih materijala, s minimalnim brojem koraka i orijentacija prema funkciji produkta koje nude biokatalizatori dobiva danas sve više na značaju.²

2. Opći dio

2.1. Enzimi ili biokatalizatori

Ime enzim dolazi od grčke riječi “en zym” što znači u kvasu, a ime ferment dolazi od latinske riječi “fermentum” što također znači kvas. Oba naziva podsjećaju na najstariji poznati enzimski preparat, kvas ili kiselo tijesto, koji se već u antičkom Egiptu upotrebljavao u proizvodnji kruha.⁴ Većina enzima djeluje unutar stanica, intracelularno, no neki se izlučuju izvan stanice i djeluju ekstracelularno. To su primjerice probavni enzimi koji su sintetizirani u različitim žlijezdama kao neaktivni enzimi-proenzimi ili zimogeni, a postaju aktivni kada dođu u probavni trakt.⁵

Biokatalizatore su prvi ispitali kemičari u prvoj polovici 20. stoljeća, a dosad je otkriveno približno 3500 vrsta biokatalizatora. Po kemijskom sastavu, biokatalizatori su proteini koji nastaju kondenzacijom aminokiselina pri čemu amino i karbonilna skupina tvore peptidnu vezu (slika 2.1.).



Slika 2.1. Peptidna veza.⁶

Neke od prednosti biokatalizatora su da se, u usporedbi s većinom klasičnih kemijskih reakcija, reakcije katalizirane enzimima provode pri blagim reakcijskim uvjetima.⁷ Biokatalizatori ubrzavaju veći broj sličnih kemijskih reakcija, nisu ograničeni na svoje prirodne supstrate, selektivni su, ekološki su prihvatljivi jer ne stvaraju mnogo otpada, biorazgradivi su i proizvode se iz obnovljivih izvora energije.⁸ Napredak u molekularnoj i strukturnoj biologiji omogućio je pristup enzimima u većim količinama. Enzimi imaju vrlo široku upotrebu, a koriste se i kao katalizatori u in-vitro sintezi asimetričnih komponenata, jer su visoko selektivni i učinkoviti.⁹

Neki nedostaci biokatalizatora su potencijalna inhibicija supstratom ili produktom. Osim toga, postupak dobivanja produkta upotrebom biokatalizatora je skup, a količina dobivenog produkta je mala. Također, biokatalizatori imaju manju aktivnost u nevedenim

medijima i aktivni su u uskom području optimalnih uvjeta (pH, temperatura, koncentracija reaktanata, itd).⁷ Neki od nedostataka su i relativno visoka cijena, te inaktivacija enzima ukoliko nisu osigurani optimalni uvjeti za njegov rad. Podložnost enzima inaktivaciji se u određenoj mjeri smanjuje imobilizacijom na čvrsti nosilac. Tim se postupkom homogeni biokatalizator prevodi u heterogeni, a takvi biokatalizatori se nazivaju imobilizirani enzimi.¹⁰ Razlikujemo heterogene biokatalizatore prve generacije i heterogene biokatalizatore druge generacije. Heterogeni biokatalizatori prve generacije su imobilizirani enzimi, a heterogeni biokatalizatori druge generacije su imobilizirane cijele stanice mikroorganizama.⁸

Upotreba enzima je najpovoljnija za sintezu i modifikaciju organskih komponenata za koje je tipično da su kompleksne, multifunkcionalne i topive u vodi. Zbog mnogo čimbenika koji mogu biti ključni za uspjeh enzimske konverzije, obavezno je upoznati se s ograničenjima enzima i uvjetima koje je potrebno osigurati za njihov rad.⁹

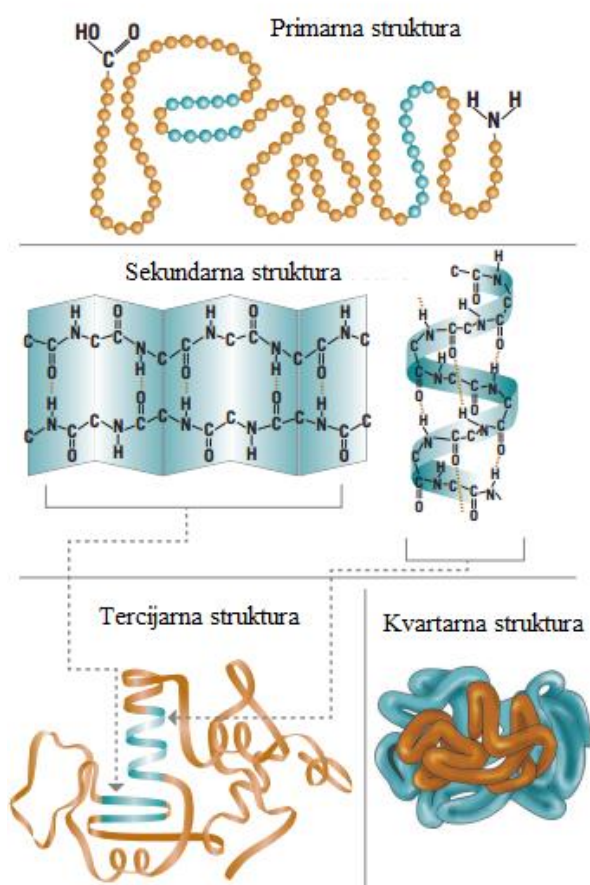
Upotreba enzima ima brojne prednosti, kao i određene nedostatke, no općenito za enzime vrijedi da reverzibilno vežu supstrat, ne mijenjaju smjer kemijske reakcije, nego ju ubrzavaju u oba smjera, a iz reakcije izlaze nepromijenjeni.¹¹

2.2. Struktura enzima

Moguće su četiri različite strukture enzima: primarna, sekundarna, tercijarna i kvartarna, koje prikazuje slika 2.2.¹⁰

Primarnu strukturu čine kratki kondenzacijski lanci aminokiselina povezani određenim redoslijedom.¹⁰ Sekundarna struktura je u obliku uzvojnice (nabrana ravnina) koja nastaje povezivanjem peptidnih lanaca vodikovim vezama u određeni oblik. Tercijarna struktura nastaje povezivanjem peptidnih lanaca kovalentnim vezama tvoreći kompaktnu i uvijenu strukturu. Kvartarna struktura je najsloženija, a sastoji se od više peptidnih lanaca koji se nazivaju podjedinice, a oni su stabilizirani disulfidnim mostovima i sekundarnim valencijskim silama.¹¹

STRUKTURA PROTEINA



Slika 2.2. Četiri moguće strukture enzima.¹²

Na aktivnost enzima utječu mnogi čimbenici kao što su pH, temperatura, koncentracija supstrata i produkta, otapalo, vezanje metalnih iona ili kofaktora, prisutstvo tenzida i slično. Učinak površinski aktivnih tvari je vrlo važan s industrijskog gledišta, jer se enzimi uvelike koriste u proizvodnji deterdženata. Također je vrlo bitan i utjecaj organskih otapala, ponajprije u proizvodnji različitih farmaceutskih produkata.¹³

Aktivnost enzima raste s porastom temperature do određenog maksimuma, a pri daljnjem povišenju temperature ona opada zbog sve veće toplinske denaturacije enzima. Postoji i pH optimum pri kojemu je aktivnost enzima maksimalna.¹⁴

Na osnovi mehanizma djelovanja, enzimi se dijele u 6 skupina: oksidoreduktaze, transferaze, hidrolaze, liaze, izomeraze i ligaze. Njihovu funkciju i neke primjere pojedinih skupina prikazuje tablica 2.1.¹⁵

Tablica 2.1. Klasifikacija enzima.¹⁵

Vrsta enzima	Funkcija	Primjeri vrste
Oksidoreduktaze	Ubrzavaju redoks reakcije.	oksidaze, dehidrogenaze
Transferaze	Ubrzavaju prijenos funkcionalnih skupina.	kinaze, aminotransferaze
Hidrolaze	Ubrzavaju hidrolizu različitih spojeva.	fosfataze, proteaze
Liaze	Ubrzavaju kidanje različitih spojeva hidrolizom i oksidacijom.	aldolaze, dekarboksilaze
Izomeraze	Ubrzavaju izomerizaciju.	racemaze, mutaze
Ligaze	Ubrzavaju spajanje dviju molekula kovalentnom vezom.	karboksilaze, sintetaze

2.3. Stabilnost enzima

Enzimska aktivnost tijekom vremena definira se kao stabilnost biokatalizatora. Svaki biokatalizator će u jednom trenutku izgubiti svoju aktivnost. Enzim će biti aktivan sve dok ne dođe do promjene u njegovoj konformaciji koja ovisi o ionskim i dipolarnim silama, kovalentnim silama, te hidrofilnim i hidrofobnim interakcijama.¹⁰ Razlikujemo dvije vrste enzimске aktivnosti: stabilnost biokatalizatora u uvjetima skladištenja i operacijsku stabilnost. Stabilnost u uvjetima skladištenja ovisi o stanju u kojemu se nalazi biokatalizator, o temperaturi (ispod 0, +4 ili 25°C), sredini u kojoj se čuva, dodatku supstrata, inhibitora, efektora. Tijekom provedbe procesa važna je operacijska stabilnost koja ima veliki utjecaj na volumnu produktivnost u reaktoru. Operacijska stabilnost definira se kao stabilnost biokatalizatora tijekom kontinuirane upotrebe.¹⁶ Operacijska aktivnost izražava se kao vrijeme poluraspada biokatalizatora, $t_{1/2}$, odnosno vrijeme koje je potrebno da se početna aktivnost biokatalizatora snizi na polovinu početne vrijednosti.¹³ Stabilnost biokatalizatora procjenjuje se određivanjem konstante deaktivacije k_d . Vrijeme poluraspada biokatalizatora i konstanta deaktivacije povezani su preko jednadžbe 2.1¹¹ Izvod za jednadžbu 2.1. može se vidjeti iz jednadžbi 2.2.-2.5.¹⁰

$$t_{1/2} = -\frac{\ln 0,5}{k_d} \quad (2.1.)$$

$$\frac{dV_m}{dt} = -k_d \cdot V_m \quad (2.2.)$$

$$\frac{dV_m}{V_m} = -k_d \cdot dt \quad (2.3.)$$

$$\int_{V_{m0}}^{0,5 \cdot V_{m0}} \frac{dV_m}{V_m} = - \int_0^{t_{1/2}} k_d \cdot dt \quad (2.4.)$$

$$\ln \frac{0,5 \cdot V_{m0}}{V_{m0}} = -k_d \cdot t_{1/2} \quad (2.5.)$$

Pretpostavlja se da se kinetika reakcije inaktivacije biokatalizatora može opisati kinetikom prvog reda. V_m u jednadžbama spomenutim ranije predstavlja maksimalnu aktivnost biokatalizatora, a t vrijeme.¹⁰

Operacijska stabilnost biokatalizatora ovisi o reaktoru u kojemu se provodi reakcija (cijevni, protočno kotlasti, kotlasti), koncentraciji supstrata, produkta i enzima, temperaturi i pH vrijednosti.¹⁷

Temperaturna stabilnost biokatalizatora ovisi o brzini denaturacije proteina. Procese u kojima sudjeluju biokatalizatori je vrlo bitno provoditi pri kontroliranim uvjetima temperature jer su biokatalizatori proteini i vrlo brzo može doći do ireverzibilne denaturacije.¹³

Aktivnost biokatalizatora u kotlastom reaktoru može se pratiti promjenom koncentracije reaktanata i produkata tijekom reakcije ili promjenom specifične aktivnosti biokatalizatora tijekom provođenja reakcije. Mjerenja se provode metodom početnih reakcijskih brzina u kotlastom reaktoru, tako da se uzimaju uzorci iz reaktora i koriste za pokretanje reakcije u enzimskom testu budući da se u uzorku nalazi enzim. Iz dobivenih podataka procjenjuje se konstanta deaktivacije.¹⁰

2.4. Izolacija enzima

Enzimi koji se koriste kao biokatalizatori mogu biti izolirani ili se mogu nalaziti u cijelim stanicama. S obzirom na mjesto gdje se enzimi nalaze u stanici, oni mogu biti unutarstanični i izvanstanični. Izvanstanične enzime je lako izolirati iz fermentacijske komine te su otporniji na promjene uvjeta u okolini. Ipak, većina enzima koje proizvode stanice su unutarstanični, a njihova izolacija je vrlo skupa. Uz to, unutarstanični enzimi su nestabilniji u odnosu na izvanstanične.¹⁸ Ako se upotrijebe cijele stanice kao izvor unutarstaničnih enzima, nije potrebno pročišćavati enzim i on je tada stabilniji jer se nalazi u svom prirodnom okruženju. Cijele stanice mogu služiti primjerice kao nosioc biokatalizatora u reakcijama u kojima se upotrebljava više enzima. Negativne strane upotrebe cijelih stanica su difuzija supstrata i produkta kroz staničnu membranu te pojava nusprodukata, zbog prisustva različitih

enzima u stanici.¹³ No ti problemi mogu se riješiti permeabilizacijom stanica. Na taj način stvaraju se male pukotine u stanici kroz koje može proći produkt i supstrat male molekulske mase.¹¹ No, ponekad je potrebno izolirati enzim iz stanice, tako da se razbije njena stanična stijenka. Potrebna energija za razbijanje stanične stijenke je ovisna o vrsti mikroorganizama i u određenoj mjeri o njihovoj fiziologiji. Neke vrste stanica se lagano razbijaju primjenom neinvazivnih metoda kao što je primjerice osmotski šok, a neke su otporne na mehaničku silu.¹⁸ Razvijene su brojne metode za razbijanje stanične stijenke, a dijele se na mehaničke i nemehaničke. Pod mehaničke metode spada razbijanje stanične stijenke ultrazvukom, miješanjem, kugličnim mlinom i visokotlačnom prešom. Nemehaničke metode se dijele na fizikalne metode kao što je temperaturni šok te kemijske metode kao što je npr. upotreba deterdženata, otapala i slično.¹⁹

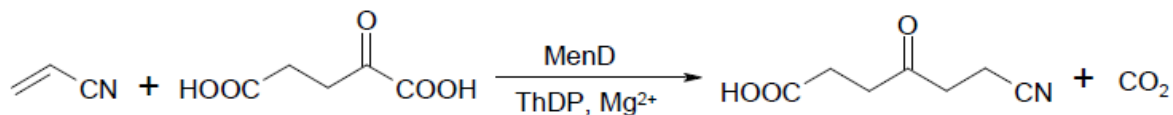
Stupanj čistoće izoliranih enzima kreće se u rasponu od djelomično pročišćenih do vrlo pročišćenih i ovisi o njihovoj primjeni. Enzimi su vrlo složeni proteini i visok stupanj specifičnosti koji posjeduju kao katalizatori se očituje u njihovoj prirodnoj konformaciji koja se održava pri određenim uvjetima pH, temperature i ionske jakosti. Stoga za izolaciju enzima mogu biti korištene samo specifične metode koje se provode u blagim uvjetima.¹⁰

2.5. Liaze

Većina liaza katalizira reverzibilnu adiciju donorskih (nukleofili) na akceptorske supstrate (elektrofili), pri čemu nastaju C-C veze. Nastajanje C-C veza je središnji proces u asimetričnoj sintezi složenih molekula. Koristeći enzimatske katalizatore, ovakve molekule mogu brzo nastati u blagim uvjetima, bez potrebe za dodatnom zaštitom osjetljive ili reaktivne funkcionalne grupe i s visokom kemijskom učinkovitosti.⁴ Većina liaza upotrebljava supstrate s funkcionalnim grupama (npr. anionskim), kao onima prisutnima u piruvatu i dihidroksiaceton fosfatu, koji ostaju nepromijenjeni tijekom katalize. Nabijene grupe prisutne u produktima ne samo da predstavljaju način vezanja supstrata s enzimom, nego mogu olakšati izolaciju proizvoda iz vodene otopine taloženjem pomoću soli ili ionsko-izmjenjivačkim metodama. Jedan od problema koji nastaje kao posljedica afiniteta enzima za anionske supstrate je inhibicija puferom.⁹

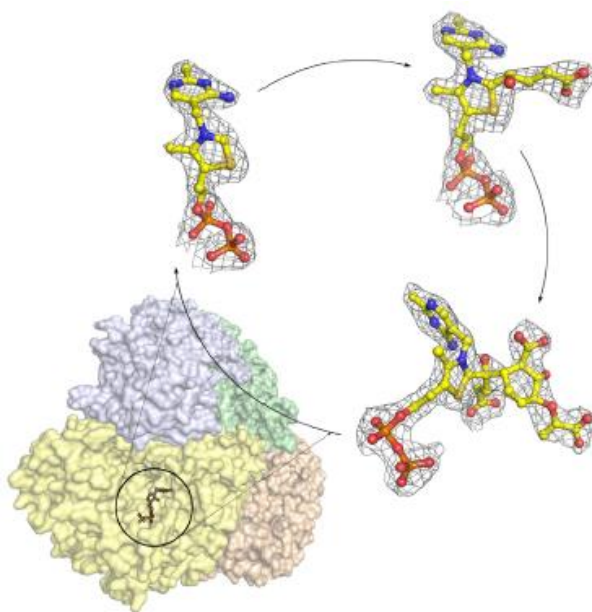
2.5.1. Sintaza 2-sukcinil-5-enolpiruvil-6-hidroksi-3-cikloheksen-1-karboksilne kiseline (MenD)

Sintaza 2-sukcinil-5-enolpiruvil-6-hidroksi-3-cikloheksen-1-karboksilne kiseline (MenD) pripada u dekarboksilaze, odnosno u skupinu liaza. On katalizira reakciju između akrilonitrila kao akceptorskog supstrata i α -ketoglutarata kao donorskog supstrata, uz tiamin difosfat kao koenzim i magnezijev ion kao kofaktor (slika 2.3.).²⁰



Slika 2.3. Shematski prikaz reakcije akrilonitrila i α -ketoglutarata katalizirana enzimom MenD.²¹

MenD (slika 2.4.) se sastoji od 4 proteinska lanca, četiri tiamin pirofosfatna liganda, trinaest atoma klora i pet atoma mangana. Uz to u strukturu ulazi i 395 molekula vode.²²



Slika 2.4. Struktura MenD enzima.²³

MenD iz *Escherichia coli* je ovisan o koenzimu tiamin difosfatu (ThDP). ThDP ovisni enzimi sudjeluju u brojnim biosintetskim putevima i kataliziraju širok raspon reakcija.²⁴ Većina ThDP ovisnih enzima mogu katalizirati asimetričnu 1,2-adiciju aktiviranih acetaldehida (deprotonirani hidroksietil-ThDP dobiven primjerice dekarboksilacijom piruvata) u aldehide (kao npr. benzaldehid) što rezultira formiranjem kiralnih 2-hidroksi

ketona.²⁴ Također, ThDP ovisni enzimi imaju primjenu u mnogim sintetički važnim reakcijama, kao što su npr. kondenzacija benzoina, asimetrična kondenzacija benzoina, sinteza bis-2-hidroksi ketona i slično.²⁵

Reakcije u kojima dolazi do transformacija aromatskih aldehida (donorski supstrat) α , β – nezasićenim karbonilnim spojevima (akceptorski supstrat) u prisutnosti cijanidnih iona ili tijazolijevih soli zovu se Stetter reakcije. Ove reakcije daju 1,4 – adicijske produkte, koji su vrlo interesantni jer se teško dobivaju ostalim katalitičkim metodama.²⁶

MenD sudjeluje u biosintezi menakinona (vitamin K2) koji je neophodna za disanje nekih patogenih bakterija kao *Mycobacterium tuberculosis*, posebno pri uvjetima niske razine kisika. Trošenje menakinona pokazalo se učinkovitim za suzbijanje rasta *M. tuberculosis* te su enzimi iz reakcija sinteze menakinona istraživani u svrhu razvoja lijekova.²⁷

Reakcije katalizirane enzimom MenD proučavane su dugi niz godina, uglavnom koristeći enzim iz bakterije *E. coli* i trebalo je puno vremena kako bi se odredila točna priroda reakcije. MenD je godinama bio poznat pod nazivom 2-sukcinil-6-hidroksi-2,4-cikloheksadien-1-karboksilat (SHCHC) sintaza, zbog relativno lake eliminacije piruvata iz SEPHCHC pri bazičnim uvjetima. Međutim, kasnijim istraživanjima pokazalo se da je SEPHCHC produkt reakcije katalizirane enzimom MenD, a eliminacija piruvata je katalizirana drugim enzimom, MenH.²⁶

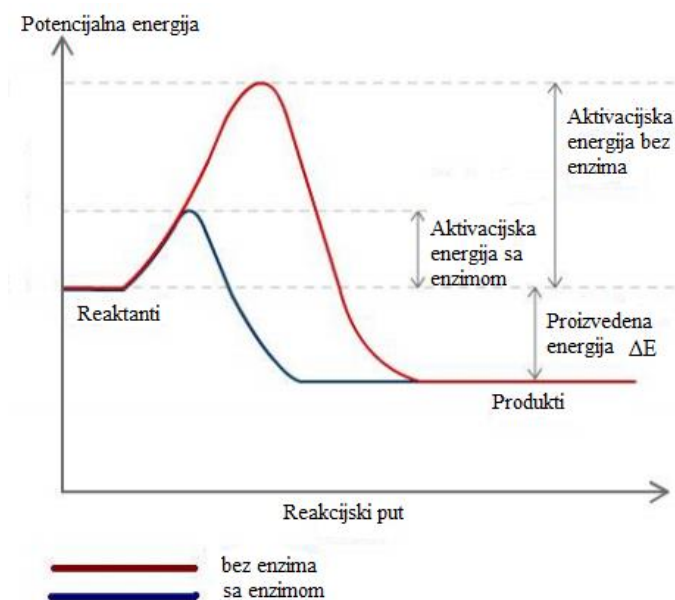
Pretpostavljeno je da MenD slijedi jednostavan ping pong kinetički mehanizam, koji je također poznat pod nazivom supstituirani enzimski mehanizam.²² Enzimi ping pong mehanizma postoje u dva oblika, nemodificirani oblik E i kemijski modificiran oblik enzima E* (intermedijer), kao što prikazuje slika 2.5. Supstrat A veže se za enzim, te nastaje enzim-supstrat ES kompleks.²⁸ Supstrat A, prelazi u produkt P i ovdje dolazi do formiranja modificiranog oblika enzima, E*. U sljedećem koraku dolazi do otpuštanja produkta P, a enzim se u svom modificiranom obliku E* veže na novi supstrat, B, koji ga nakon otpuštanja novog produkta Q, vraća u nemodificirani oblik E.²⁹



Slika 2.5. Ping pong mehanizam enzimske reakcije.²⁹

2.6. Enzimska kinetika

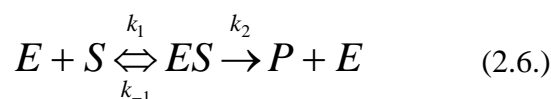
Da bi se neka kemijska reakcija odvijala, supstrat mora imati dovoljnu energiju kako bi prešao energetska barijeru potrebnu za stvaranje produkta (slika 2.6.), odnosno, mora se aktivirati do dovoljne energetske razine.³⁰



Slika 2.6. Prikaz reakcijskog puta bez enzima i s enzimom.³⁰

Reakcija katalizirana enzimom ima sniženu energiju aktivacije, odnosno energetska barijeru, jer je enzim-supstrat kompleks na višoj energetskoj razini od slobodnog supstrata.³¹

Početkom 20. st. kinetiku enzimске reakcije istraživali su Michaelis i Menten. Pretpostavili su da supstrat (S) može biti preveden u produkt (P) samo uz prisustvo enzima (E), stvarajući enzim-supstrat (ES) kompleks, što se može opisati jednačbom 2.6:³¹



Dakle reakcijom enzima i supstrata nastaje ES kompleks uz konstantu brzine k_1 . ES kompleks može disocirati na E i S konstantom brzine k_{-1} ili može formirati proizvod uz konstantu brzine k_2 . Ovaj model vrijedi za jednosupstratnu reakciju.³² Ukoliko se zanemari povratna reakcija, početna brzina nastajanja produkta, proporcionalna je koncentraciji ES kompleksa (jednačba 2.7.). Brzina formiranja i raspada ES kompleksa mogu se opisati jednačbama: 2.8. i 2.9.³²

$$r_0 = k_2 [ES] \quad (2.7.)$$

$$ES = k_1 [E][S] \quad (2.8.)$$

$$ES = (k_{-1} + k_2) [ES] \quad (2.9.)$$

Predpostavi li se da je uspostavljeno stacionarno stanje, odnosno stanje u kojemu je koncentracija kompleksa ES konstantna, dobije se jednačba 2.10., odnosno jednačba 2.11.³³

$$k_1 [E][S] = (k_{-1} + k_2) [ES] \quad (2.10.)$$

$$\frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{(k_{-1} + k_2)}{k_1} \quad (2.11.)$$

Jednačba 2.11. može se pojednostaviti uvođenjem Michaelisove konstante K_m , te se cijeli izraz može napisati kako prikazuje jednačba 2.12.³³

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad (2.12.)$$

Michaelisova konstanta (K_m) numerički izražava afinitet enzima prema supstratu, definira se kao koncentracija supstrata kod koje je brzina reakcije jednaka polovici maksimalne brzine, a ovisi o supstratu, pH i temperaturi. Eksperimentalno se određuje mjerenjem početne brzine reakcije (v_0) pri različitim koncentracijama supstrata.³²

Maksimalna brzina enzimski katalizirane reakcije (jednačba 2.13.) ostvaruje se kada su sve molekule enzima u obliku enzim supstrat kompleksa:³¹

$$V_m = k_2 [E_0] \quad (2.13.)$$

Na temelju jednačbi 2.11., 2.12., i 2.13., moguće je izvesti Michaelis-Menteničinu jednačbu (jednačba 2.14.). Izraz za Michaelis-Menteničinu jednačbu glasi ³¹:

$$r_0 = \frac{V_m [S]}{(K_m + [S])} \quad (2.14.)$$

Maksimalna brzina reakcije V_m i Michaelisova konstanta K_m , važni su kinetički parametri za opisivanje enzimski kataliziranih reakcija.³¹

3. Eksperimentalni dio

3.1. Aparatura

3.1.1. Kapljevinska kromatografija visokog učinka (HPLC)

Koncentracije reaktanata i produkta određivane su na HPLC Shimadzu (Japan) (slika 3.1.).



Slika 3.1. Kapljevinski kromatograf visokog učinka.

3.1.2. Spektrofotometar

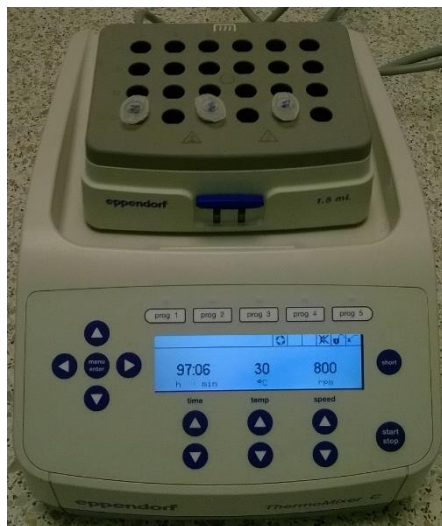
Aktivnost enzima mjerena je na spektrofotometru Shimadzu UV-1601 (Japan) (slika 3.2.).



Slika 3.2. Spektrofotometar Shimadzu UV-1601.

3.1.3. Eppendorf tresilica

Reaktori u kojima su provođene reakcije termostatisirani su na Eppendorf ThermoMixer C tresilici (Njemačka) pri 30 °C i 1000 okr min⁻¹ (slika 3.3.).



Slika 3.3. Eppendorf ThermoMixerC tresilica.

3.1.4. Analitička vaga

Za vaganje potrebnih tvari (α -ketoglutarata, tiamin difosfata i dr.) korištena je analitička vaga na četiri decimale Shimadzu AUW120 (Japan) (slika 3.4.).



Slika 3.4. Analitička vaga.

3.1.5. Homogenizator

Homogenizator IKA MS2 Minishaker (SAD) korišten je prilikom pripreve otopina (slika 3.5.).



Slika 3.5. Homogenizator IKA MS2 Minishaker.

3.2. Materijali

Kemikalije korištene u radu prikazuje tablica 3.1.

Tablica 3.1. Kemikalije korištene u radu.

NAZIV KEMIČKE	PROIZVOĐAČ	ZEMLJA PODRIJETLA
Akilonitril	Fluka	SAD
α -Ketoglutarat	Sigma Aldrich	Švicarska
(2S, 3S)-2,3-Dihidroksi-2,3-dihidrobenzoat (2,3 – CHD)	University of Freiburg	Njemačka
Magnezijev klorid	Acros Organics	SAD
MenD-WT	Prozomix	Ujedinjeno Kraljevstvo
Metanol	J.T.Baker	Nizozemska
O-Benzilhidroksilamin hidroklorid	Acros Organics	SAD
Tiamin difosfat (ThDP)	Sigma	Švicarska

3.3. HPLC metode

Analiza za određivanje koncentracije reaktanata provedena je pri 30°C s protokom mobilne faze od 1 cm³/min, na koloni Hypersil APS (HP) C18 5 μ m, 4,6 x 200 mm. Mobilna faza A je bila voda s dodatkom TFA (0,1% v/v). Analiza je provedena pri 195 nm. Retencijsko vrijeme akrilonitrila je 3.95 min, a α -ketoglutarata 6.7 min.

Produkt ove reakcije nije moguće pratiti koristeći prethodno opisanu metodu, pa je provedena derivatizacija produkta. Derivatizacija uzoraka je provedena na način da je 5 μ L uzorka preneseno u 50 μ L derivatizacijske otopine (otopina za derivatizaciju sadrži 200 mg O-benzilhidroksilamina hidroklorida, 6,6 cm³ piridina, 3 cm³ metanola i 0,4 cm³ vode) i

termostatirano 20 min pri 25° i 1000 okr min⁻¹. Nakon toga je dodano 450 µL metanola i uzorak je profiltriran hidrofilnim PTFE filterom veličina pora 0,2 µm za analizu na HPLC-u. Analiza za određivanje koncentracije produkta je provedena pri 30°C s protokom mobilne faze od 1,2 cm³/min na Phenomenex RP-18 LiChrospher® C18 5 µm, 4 x 250 mm koloni. Mobilna faza A je bila voda s dodatkom TFA (0.1% v/v), a mobilna faza B je bila smjesa acetonitrila, vode i TFA u omjeru 80:20:0.095. Gradijent je postavljen od 10 do 70% B prvih 25 minuta i od 70 do 10% B od 25. do 32. minute. Analiza je provedena na 215 nm. Retencijsko vrijeme derivatiziranog produkta je 19,5 min.

Napravljeni su i baždarni dijagrami za akrilonitril i α-ketoglutarat. Baždarni pravac za akrilonitril napravljen je tako da su pripremljene otopine akrilonitrila koncentracija: 0,1 mmol dm⁻³, 0,2 mmol dm⁻³, 0,5 mmol dm⁻³, 1 mmol dm⁻³ i 1,9 mmol dm⁻³. Uzorci su potom analizirani na HPLC-u. Baždarni dijagram za akrilonitril nalazi se u Prilogu 1. Baždarni dijagram za α-ketoglutarat napravljen su pripremljene otopine α-ketoglutarata koncentracija: 0,1 mmol dm⁻³, 0,2 mmol dm⁻³, 0,5 mmol dm⁻³ i 0,9 mmol dm⁻³. Uzorci su potom analizirani na HPLC-u. Baždarni dijagram za α-ketoglutarat nalazi se u Prilogu 2.

3.4. Mjerenje aktivnosti enzima MenD

Aktivnost enzima MenD mjerena je spektrofotometrijski, pomoću (2S, 3S)-2,3-Dihidroksi-2,3-dihidrobenzoata (2,3-CHD) pri 279 nm, te je na temelju promjena apsorbancije u vremenu bilo je moguće odrediti volumnu aktivnost (jednadžba 3.1.) i specifičnu aktivnost (jednadžba 3.2.). Primjer određivanja nagiba pravca za izračun volumne i specifične aktivnosti enzima nalazi se u Prilogu 3.

$$V.A. = \frac{dc}{dt} \frac{V_r}{V_{enzim}} \left(\frac{U}{mL} \right) \quad (3.1.)$$

$$S.A. = \frac{V.A.}{\gamma_{enzim}} \left(\frac{U}{mg} \right) \quad (3.2.)$$

Reakcija za mjerenje aktivnosti enzima pokrenuta je uzorkom iz reaktora u kojemu je provođena reakcija s akrilonitrilom i α-ketoglutaratom katalizirana enzimom MenD. Reaktor za mjerenje aktivnosti enzima, volumena 1 cm³, sadržavao je 50 mmol dm⁻³ fosfatni pufer pH 8, c_{2,3 CHD} = 9,79 mmol dm⁻³, c_{α-ketoglutarat} = 10,49 mmol dm⁻³, c_{Mg²⁺} = 1,99 mmol dm⁻³, c_{ThDP} =

0,49 mmol dm⁻³, 20% v/v enzima. Reakcija je provedena pri 30°C i 1000 okr min⁻¹. Uzorci su uzimani u određenim vremenskim razmacima, razrijeđeni 200 puta u ultra čistoj vodi, a zatim su analizirani na spektrofotometru pri 279 nm.

Napravljen je i baždarni dijagram za 2,3-CHD kako bi bilo moguće odrediti aktivnost enzima. Baždarni dijagram 2,3-CHD-a napravljen je tako su pripremljene otopine 2,3-CHD-a koncentracija: 0,01 mmol dm⁻³, 0,04 mmol dm⁻³, 0,05 mmol dm⁻³, 0,08 mmol dm⁻³ i 0,1 mmol dm⁻³. Dobiveni uzorci analizirani su na spektrofotometru na 279 nm. Baždarni pravac za CHD nalazi se u Prilogu 4.

3.5. Provođenje reakcije između akrilonitrila i α-ketoglutarata katalizirane enzimom MenD u kotlastom reaktoru

Reakcija između akrilonitrila i α-ketoglutarata katalizirana enzimom MenD provedena je u kotlastom reaktoru tijekom 25 sati. Mjerena je koncentracija reaktanata, produkta te aktivnost enzima prema prethodno opisanim postupcima. Reakcijska smjesa sastojala se od 50 mmol dm⁻³ fosfatnog pufera pH 8,0, $c_{\text{akrilonitril}} = 127,15 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c_{\alpha\text{-ketoglutarat}} = 240 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c_{\text{Mg}^{2+}} = 1,99 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c_{\text{ThDP}} = 0,99 \text{ mmol dm}^{-3}$, 50% v/v enzima. Volumen reakcijske smjese iznosio je 1 cm³, a reakcija je provedena pri 30°C i 1000 okr min⁻¹.

3.6. Ponovljivi eksperiment u kotlastom reaktoru

Proveden je ponovljivi eksperiment u kotlastom reaktoru, tako da je pokrenuta reakcija između akrilonitrila i α-ketoglutarata katalizirana enzimom MenD. Provedeno je mjerenje koncentracija supstrata, produkta i aktivnost enzima MenD prema prethodno opisanim postupcima. Reakcijska smjesa sastojala se od 50 mmol dm⁻³ fosfatnog pufera pH 8,0, $c_{\text{akrilonitril}} = 15 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c_{\alpha\text{-ketoglutarat}} = 30 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c_{\text{Mg}^{2+}} = 1,99 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c_{\text{ThDP}} = 0,99 \text{ mmol dm}^{-3}$, 50% v/v enzima. Volumen reakcijske smjese iznosio je 1 cm³, a reakcija je provedena pri 30°C i 1000 okr min⁻¹.

Nakon 24 i 48 h u reaktor u kojemu je provedena reakcija dodani su supstrati 15 mmol dm⁻³ akrilonitrila i 15 mmol dm⁻³ α-ketoglutarata. Na taj način postignuti su isti početni uvjeti kao prije 24 i 48 h, no bez dodavanja enzima.

3.7. Utjecaj koncentracije akrilonitrila tijekom inkubacije na deaktivaciju enzima MenD

Ispitan je utjecaj koncentracije akrilonitrila tijekom inkubacije na deaktivaciju enzima MenD. Koncentracije akrilonitrila u reaktoru iznosile su: 15 mmol dm⁻³, 100 mmol dm⁻³, 250 mmol dm⁻³, 500 mmol dm⁻³, 750 mmol dm⁻³, 900 mmol dm⁻³, 1000 mmol dm⁻³. Volumen reaktora uvijek je bio 1 cm³, inkubacija je provedena pri 30°C i 1000 okr min⁻¹, a ostali uvjeti su bili sljedeći: 50 mmol dm⁻³ fosfatni pufer pH 8, $c_{\text{Mg}^{2+}} = 2,0 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c_{\text{ThDP}} = 1,0 \text{ mmol dm}^{-3}$, 50 % v/v enzima i $c_{\text{akrilonitril}}$ određene koncentracije. Aktivnost enzima je mjerena u određenim vremenskim razmacima na način opisan u poglavlju 3.5.

4. Matematički model

Kinetika sinteze akrilonitrila i α -ketoglutarata opisana je dvosupstratnom Michaelis-Menteničinom kinetikom i prikazana je jednađbama 4.1.i 4.2. Valja uzeti u obzir da je akrilonitril nespecifičan supstrat, pa se brzina reakcije u ovisnosti o njegovoj koncentraciji opisuje kinetikom prvoga reda. Kako koenzim ThDP i kofaktor Mg^{2+} ne sudjeluju u reakciji kao supstrati, no imaju utjecaj na brzinu reakcije, njihov je utjecaj kvantificiran u obliku faktora f danog u jednađbi 4.2.

$$r = \frac{k \cdot f \cdot \gamma_{MenD} \cdot c_{\alpha-KG}}{K_m^{\alpha-KG} + c_{\alpha-KG}} \cdot c_{AN} \quad (4.1.)$$

$$f = \frac{c_{ThDP} \cdot c_{Mg^{2+}}}{\left(K_m^{ThDP} + c_{ThDP} \right) \cdot \left(K_m^{Mg^{2+}} + c_{Mg^{2+}} + \frac{c_{Mg^{2+}}^2}{K_i^{Mg^{2+}}} \right)} \quad (4.2.)$$

Polimerizacija akrilonitrila opisana je kinetikom prvoga reda i prikazana je jednađbom 4.3., a bilancne jednađbe prikazane su jednađbama 4.4.-4.6. Bilancne jednađbe odnose se na supstrate, α -ketoglutarat (KG) i akrilonitril (AN), te produkt 6-cijano-4-ketoheksansku kiselinu (P). Operacijska stabilnost enzima prikazana je jednađbom 4.7.

$$r_1 = k \cdot c_{AN} \quad (4.3.)$$

$$\frac{dc_{KG}}{dt} = -r \quad (4.4.)$$

$$\frac{dc_{AN}}{dt} = -r - r_1 \quad (4.5.)$$

$$\frac{dc_P}{dt} = r \quad (4.6.)$$

$$\frac{dV_m}{dt} = -k_d \cdot V_m \quad (4.7.)$$

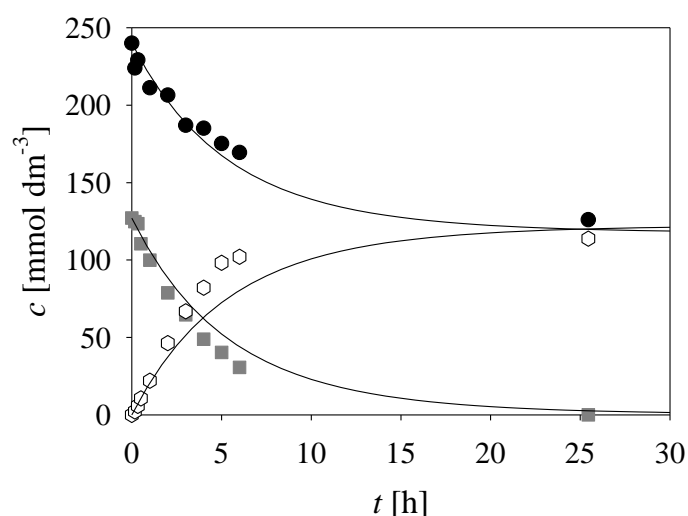
Simulacija je napravljena u programskom paketu Scientist (Prilog 5.), a potrebni parametri preuzeti su iz literature.²¹

5. Rezultati i rasprava

U ovom radu provedena je reakcija između α -ketoglutarata i akrilonitrila katalizirana enzimom MenD u kotlastom reaktoru. Proveden je i ponovljivi eksperiment u kotlastom reaktoru u koji su nakon 24 i 48 h dodani supstrati bez dodavanja enzima. Također, provedeni su eksperimenti kojima se utvrdio utjecaj koncentracije akrilonitrila na deaktivaciju enzima MenD.

5.1. Reakcija između akrilonitrila i α -ketoglutarata katalizirana enzimom MenD u kotlastom reaktoru

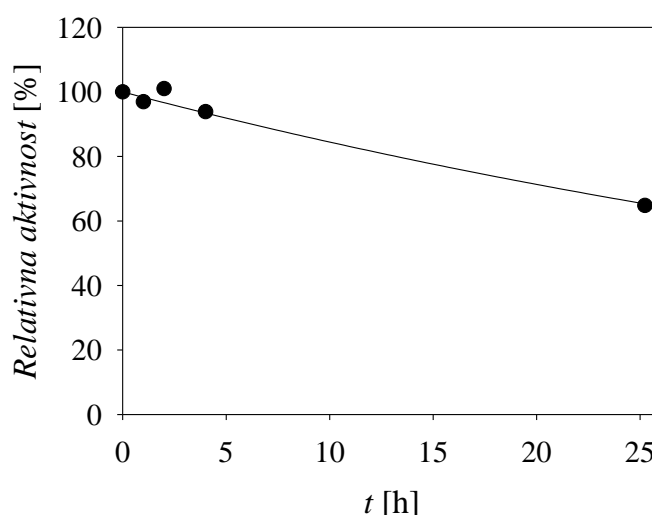
Provedena je reakcija u kotlastom reaktoru između akrilonitrila (akceptorski supstrat) i α -ketoglutarata (donorski supstrat), uz tiamin difosfat kao koenzim i magnezijeve ione kao kofaktor, katalizirana enzimom MenD. Praćena je potrošnja supstrata, nastanak produkta i aktivnost enzima.



Slika 5.1. Reakcija u kotlastom reaktoru između α -ketoglutarata i akrilonitrila katalizirana enzimom MenD (50 mmol dm⁻³ fosfatni pufer pH 8.0, $V_r = 1$ cm³, 30 °C, 1000 okr min⁻¹, 50% enzima u reaktoru, $c_{\text{akrilonitril}} = 127,15$ mmol dm⁻³, $c_{\alpha\text{-ketoglutarat}} = 240$ mmol dm⁻³, $c_{\text{Mg}^{2+}} = 1,99$ mmol dm⁻³, $c_{\text{ThDP}} = 0,99$ mmol dm⁻³). (Legenda: ● - koncentracija α -ketoglutarata, ■ - koncentracija akrilonitrila, ○ - koncentracija produkta).

Rezultati (slika 5.1.) pokazuju da se tijekom provođenja reakcije smanjuju koncentracije reaktanata i povećava koncentracija produkta, a matematički model (jednadžbe 4.1.-4.6.) dobro opisuje eksperimentalne. Koncentracija dobivenog produkta nešto je manja nego koncentracija mjerodavnog reaktanta – akrilonitrila, zbog njegove polimerizacije tijekom reakcije. Akrilonitril se u reakciji potrošio do kraja dok α -ketoglutarat nije budući da je njegova koncentracija bila veća.

Mjerena je i aktivnost enzima MenD tijekom provođenja reakcije, a rezultati (slika 5.2.) pokazuju da se tijekom provođenja reakcije smanjuje relativna aktivnost enzima i nakon 25 sati ona iznosi oko 65%. Budući da je relativna aktivnost enzima visoka, reakcija se uspješno može provoditi i nakon 25 sati.



Slika 5.2. Aktivnost enzima MenD u kotlastom reaktoru (50 mmol dm^{-3} fosfatni pufer pH 8.0, $V_r = 0,1 \text{ cm}^3$, $30 \text{ }^\circ\text{C}$, $1000 \text{ okr min}^{-1}$, 20% enzima u reaktoru, $c_{2,3 \text{ CHD}} = 9,79 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c_{\alpha\text{-ketoglutarat}} = 10,49 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c_{\text{Mg}^{2+}} = 1,99 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c_{\text{ThDP}} = 0,49 \text{ mmol dm}^{-3}$).

Na temelju rezultata prikazanih na slici 5.2., procijenjena je konstanta deaktivacije enzima koju prikazuje tablica 5.1.

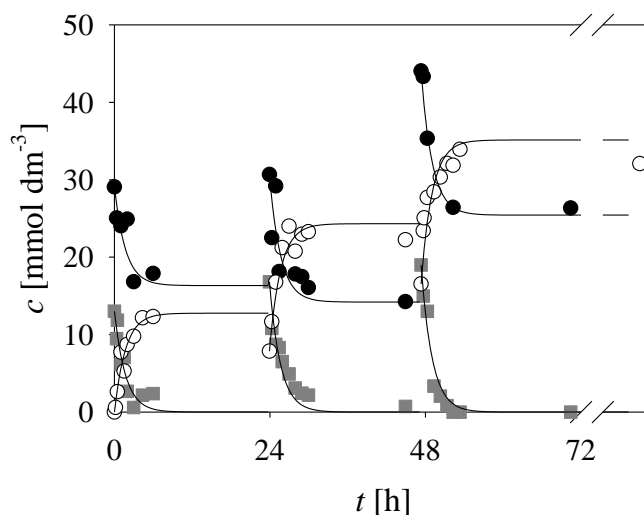
Tablica 5.1. Konstanta deaktivacije enzima u kotlastom eksperimentu prikazanom na slici 5.2.

Parametar	Jedinica	Vrijednost
k_d	d^{-1}	$0,405 \pm 0,032$

5.2. Provođenje ponovljivog eksperimenata

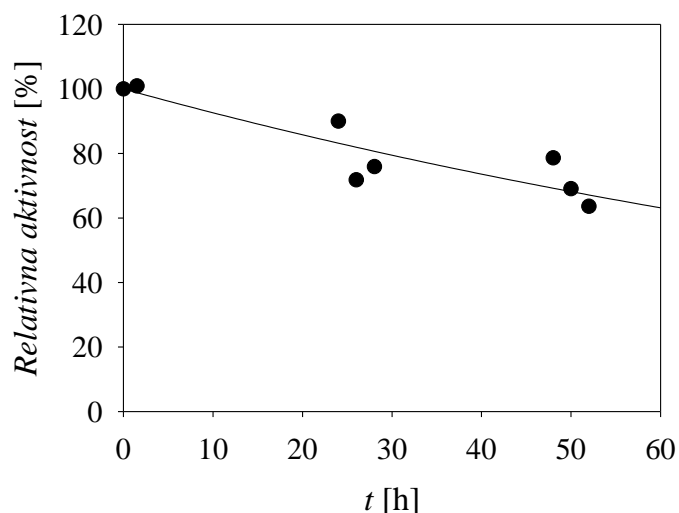
Ponovljivi eksperiment proveden je na način da je pokrenuta reakcija u kotlastom reaktoru, a zatim su dodavani svježi reaktanti nakon 24 i 48 h kako bi se postigli početni uvjeti reakcije. Ova reakcija je provedena kako bi se pokazalo da je enzim dovoljno aktivan da katalizira reakciju u trajanju od 72 sata, uz dodavanje svježeg supstrata. Iz rezultata (slika 5.1.) je vidljivo da je došlo do trošenja reaktanata i nastajanja produkta, što je i očekivano, a matematički model (jednadžbe 4.1.-4.6.) dobro opisuje dobivene eksperimentalne podatke. Akrilonitril se potrošio do kraja, dok α -ketoglutarat nije budući da je njegova koncentracija uvijek bila veća.

Koncentracija produkta nakon 24 sata jednaka je 12 mmol dm^{-3} . To je nešto manje od početne koncentracije mjerodavnog reaktanta koja je iznosila 15 mmol dm^{-3} , a razlog tome je polimerizacija akrilonitrila koja se događa tijekom reakcije. Nakon nešto više od 24 sata dodani su svježi supstrati i u tom slučaju koncentracija produkta je veća i iznosi približno 25 mmol dm^{-3} , a najveća koncentracija produkta nastala je nakon posljednjeg dodavanja svježih supstrata, nakon 48 sati i iznosila je približno 35 mmol dm^{-3} . Povećanjem koncentracije supstrata linearno se povećava brzina reakcije.



Slika 5.3. Ponovljivi eksperiment u kotlastom reaktoru (50 mmol dm^{-3} fosfatni pufer pH 8.0, $V_r = 1 \text{ cm}^3$, $30 \text{ }^\circ\text{C}$, $1000 \text{ okr min}^{-1}$, 50% enzima u reaktoru, $c_{\text{akrilonitril}} = 15 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c_{\alpha\text{-ketoglutarat}} = 30 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c_{\text{Mg}^{2+}} = 1,97 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c_{\text{ThDP}} = 0,99 \text{ mmol dm}^{-3}$, nakon 24 i 48 h dodano 15 mmol dm^{-3} α -ketoglutarata i 15 mmol dm^{-3} akrilonitrila u reaktor). (Legenda: • - koncentracija α -ketoglutarata, ■ - koncentracija akrilonitrila, o - koncentracija produkta).

Mjerena je i aktivnost enzima MenD tijekom provođenja ove reakcije, a rezultati pokazuju da se relativna aktivnost enzima MenD tijekom provođenja reakcije smanjuje na 65% (slika 5.4.) . Prema tome, enzim je dovoljno aktivan da katalizira reakciju u kojoj se dodaju svježiji supstrati, bez dodavanja enzima.



Slika 5.4. Aktivnost enzima MenD tijekom ponovljivog kotlastog eksperimenta (50 mmol dm^{-3} fosfatni pufer pH 8.0, $V_r = 0,1 \text{ cm}^3$, $30 \text{ }^\circ\text{C}$, $1000 \text{ okr min}^{-1}$, 20% enzima u reaktoru, $c_{2,3 \text{ CHD}} = 10 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c_{\alpha\text{-ketoglutarat}} = 10 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c_{\text{Mg}^{2+}} = 2,1 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c_{\text{ThDP}} = 0,49 \text{ mmol dm}^{-3}$).

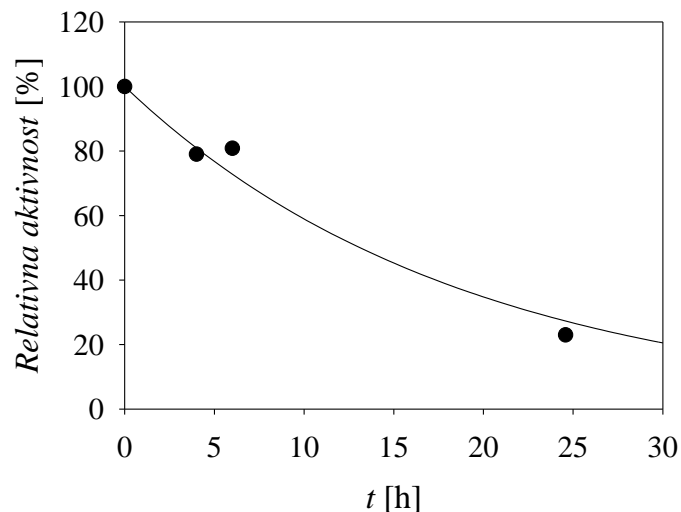
Na temelju rezultata prikazanih na slici 5.4., procijenjena je konstanta deaktivacije enzima koju prikazuje tablica 5.2.

Tablica 5.2. Konstanta deaktivacije enzima u ponovljivom kotlastom eksperimentu prikazanom na slici 5.4.

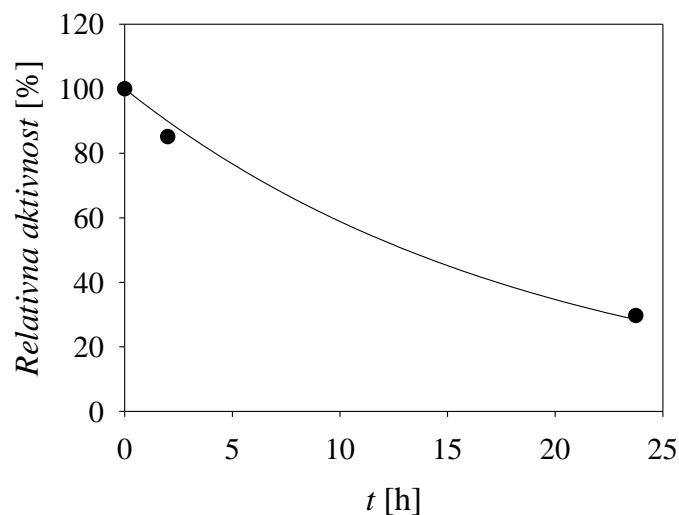
Parametar	Jedinica	Vrijednost
k_d	d^{-1}	$0,182 \pm 0,022$

5.3. Utjecaj koncentracije akrilonitrila na deaktivaciju enzima MenD

Ispitan je utjecaj koncentracije akrilonitrila na deaktivaciju enzima MenD u rasponu koncentracija od 15 do $1000 \text{ mmol dm}^{-3}$.



Slika 5.5. Aktivnost enzima u reakcijskoj smjesi pri koncentraciji akrilonitrila od 15 mmol dm⁻³ (50 mmol dm⁻³ fosfatni pufer pH 8.0, $V_r = 1 \text{ cm}^3$, 30 °C, 1000 okr min⁻¹, 50% enzima u reaktoru, $c_{\text{akrilonitril}} = 15 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c_{\text{Mg}^{2+}} = 2,0 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c_{\text{ThDP}} = 1,0 \text{ mmol dm}^{-3}$; mjerenje aktivnosti: 50 mmol dm⁻³ fosfatni pufer pH 8.0, $V_r = 0,1 \text{ cm}^3$, 30 °C, 1000 okr min⁻¹, 20% enzima u reaktoru, $c_{2,3 \text{ CHD}} = 9,97 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c_{\alpha\text{-ketoglutarat}} = 10,17 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c_{\text{Mg}^{2+}} = 2,0 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c_{\text{ThDP}} = 0,5 \text{ mmol dm}^{-3}$).

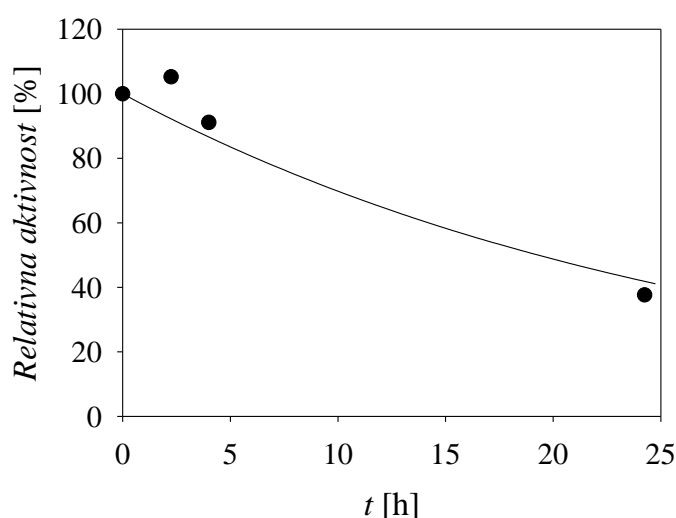


Slika 5.6. Aktivnost enzima u reakcijskoj smjesi pri koncentraciji akrilonitrila od 150 mmol dm⁻³ (50 mmol dm⁻³ fosfatni pufer pH 8.0, $V_r = 1 \text{ cm}^3$, 30 °C, 1000 okr min⁻¹, 50% enzima u reaktoru, $c_{\text{akrilonitril}} = 150 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c_{\text{Mg}^{2+}} = 2,0 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c_{\text{ThDP}} = 1,0 \text{ mmol dm}^{-3}$; mjerenje aktivnosti: 50 mmol dm⁻³ fosfatni pufer pH 8.0, $V_r = 0,1 \text{ cm}^3$, 30 °C, 1000 okr min⁻¹, 20% enzima u reaktoru, $c_{2,3 \text{ CHD}} = 9,97 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c_{\alpha\text{-ketoglutarat}} = 10,17 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c_{\text{Mg}^{2+}} = 2,0 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c_{\text{ThDP}} = 0,5 \text{ mmol dm}^{-3}$).

Slika 5.5. prikazuje promjenu aktivnosti enzima tijekom inkubacije pri koncentraciji akrilonitrila od 15 mmol dm^{-3} . Aktivnost enzima se smanjuje tijekom vremena, a relativna aktivnost nakon 25 sati pada na 23%.

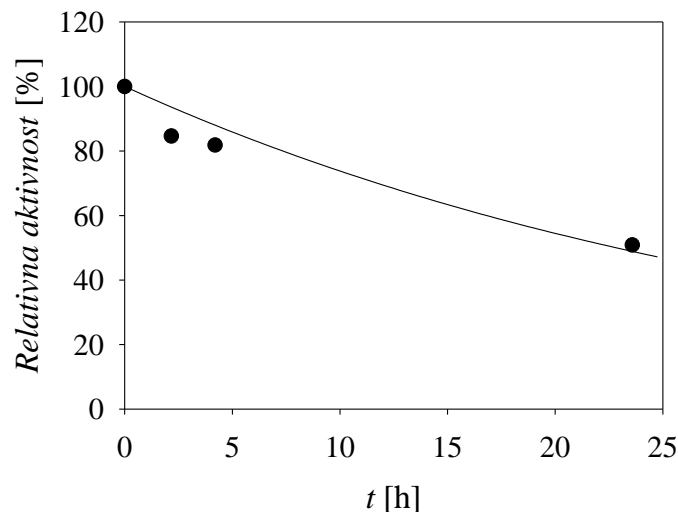
Slika 5.6. prikazuje promjenu aktivnosti enzima tijekom inkubacije pri koncentraciji akrilonitrila od 100 mmol dm^{-3} . Aktivnost enzima opada tijekom vremena i nakon 23 sata relativna aktivnost iznosi 30%.

Slika 5.7. prikazuje promjenu aktivnosti enzima tijekom inkubacije pri koncentraciji akrilonitrila od 250 mmol dm^{-3} . Aktivnost enzima opada tijekom vremena. Nakon 24 sata relativna aktivnost iznosi 40%.



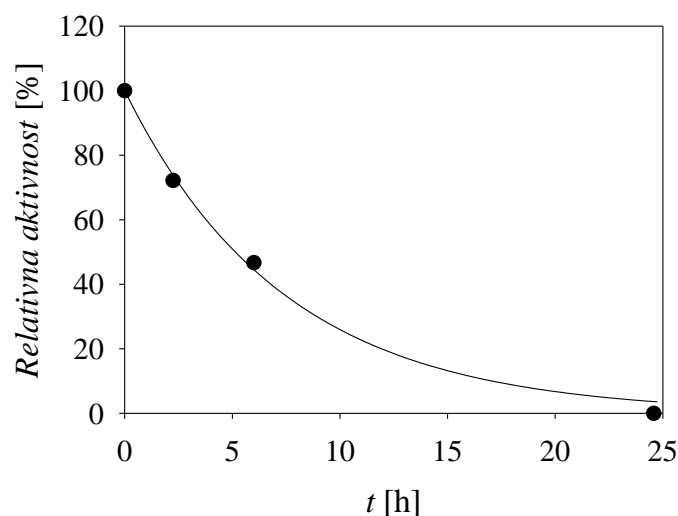
Slika 5.7. Aktivnost enzima u reakcijskoj smjesi pri koncentraciji akrilonitrila od 250 mmol dm^{-3} (50 mmol dm^{-3} fosfatni pufer pH 8.0, $V_r = 1 \text{ cm}^3$, $30 \text{ }^\circ\text{C}$, $1000 \text{ okr min}^{-1}$, 50% enzima u reaktoru, $c_{\text{akrilonitril}} = 250 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c_{\text{Mg}^{2+}} = 2,0 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c_{\text{ThDP}} = 1,0 \text{ mmol dm}^{-3}$; mjerenje aktivnosti: 50 mmol dm^{-3} fosfatni pufer pH 8.0, $V_r = 0,1 \text{ cm}^3$, $30 \text{ }^\circ\text{C}$, $1000 \text{ okr min}^{-1}$, 20% enzima u reaktoru, $c_{2,3 \text{ CHD}} = 9,97 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c_{\alpha\text{-ketoglutarat}} = 10,17 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c_{\text{Mg}^{2+}} = 2,0 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c_{\text{ThDP}} = 0,5 \text{ mmol dm}^{-3}$).

Slika 5.8. prikazuje promjenu aktivnosti enzima tijekom inkubacije pri koncentraciji akrilonitrila od 500 mmol dm^{-3} . Aktivnost enzima opada tijekom vremena. Nakon 23 sati relativna aktivnost iznosi 51%.



Slika 5.8. Aktivnost enzima u reakcijskoj smjesi pri koncentraciji akrilonitrila od 500 mmol dm⁻³ (50 mmol dm⁻³ fosfatni pufer pH 8.0, $V_r = 1 \text{ cm}^3$, 30 °C, 1000 okr min⁻¹, 50% enzima u reaktoru, $c_{\text{akrilonitril}} = 500 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c_{\text{Mg}^{2+}} = 2,0 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c_{\text{ThDP}} = 1,0 \text{ mmol dm}^{-3}$; mjerenje aktivnosti: 50 mmol dm⁻³ fosfatni pufer pH 8.0, $V_r = 0,1 \text{ cm}^3$, 30 °C, 1000 okr min⁻¹, 20% enzima u reaktoru, $c_{2,3 \text{ CHD}} = 9,97 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c_{\alpha\text{-ketoglutarat}} = 10,17 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c_{\text{Mg}^{2+}} = 2,0 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c_{\text{ThDP}} = 0,5 \text{ mmol dm}^{-3}$).

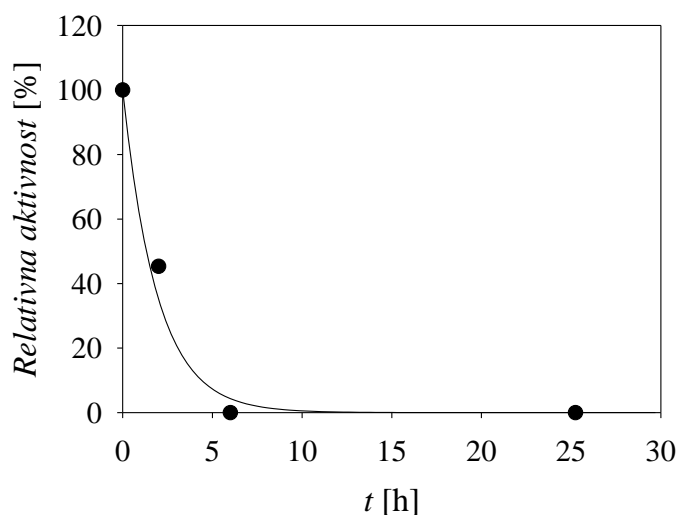
Slika 5.9. prikazuje promjenu aktivnosti enzima tijekom inkubacije pri koncentraciji akrilonitrila od 750 mmol dm⁻³. Aktivnost enzima opada tijekom vremena. Nakon 25 sati relativna aktivnost iznosi 5%.



Slika 5.9. Aktivnost enzima u reakcijskoj smjesi pri koncentraciji akrilonitrila od 750 mmol dm⁻³ (50 mmol dm⁻³ fosfatni pufer pH 8.0, $V_r = 1 \text{ cm}^3$, 30 °C, 1000 okr min⁻¹, 50% enzima u

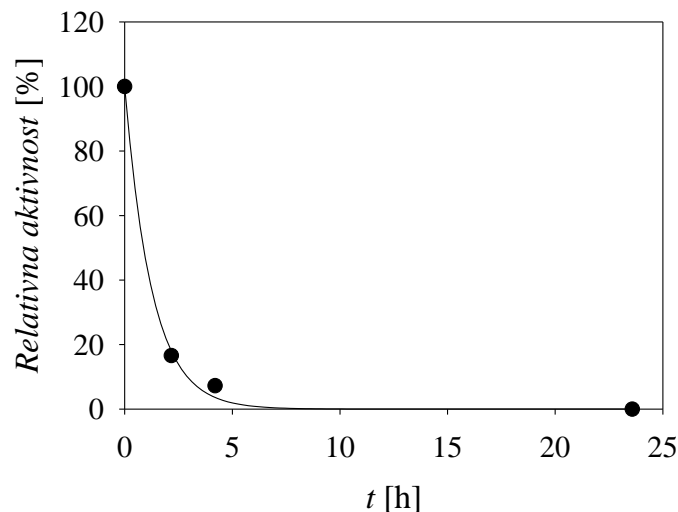
reaktoru, $c_{\text{akrilonitril}} = 750 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c_{\text{Mg}^{2+}} = 2,0 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c_{\text{ThDP}} = 1,0 \text{ mmol dm}^{-3}$; mjerenje aktivnosti: 50 mmol dm^{-3} fosfatni pufer pH 8.0, $V_r = 0,1 \text{ cm}^3$, $30 \text{ }^\circ\text{C}$, $1000 \text{ okr min}^{-1}$, 20% enzima u reaktoru, $c_{2,3 \text{ CHD}} = 9,97 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c_{\alpha\text{-ketoglutarat}} = 10,17 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c_{\text{Mg}^{2+}} = 2,0 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c_{\text{ThDP}} = 0,5 \text{ mmol dm}^{-3}$).

Slika 5.10. prikazuje promjenu aktivnosti enzima tijekom inkubacije pri koncentraciji akrilonitrila od 900 mmol dm^{-3} . Aktivnost enzima opada tijekom vremena i nakon 10 sati relativna aktivnost pada na nulu. Ovdje je vidljivo da aktivnost enzima naglo pada zbog velike koncentracije supstrata.



Slika 5.10. Aktivnost enzima u reakcijskoj smjesi pri koncentraciji akrilonitrila od 900 mmol dm^{-3} (50 mmol dm^{-3} fosfatni pufer pH 8.0, $V_r = 1 \text{ cm}^3$, $30 \text{ }^\circ\text{C}$, $1000 \text{ okr min}^{-1}$, 50% enzima u reaktoru, $c_{\text{akrilonitril}} = 900 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c_{\text{Mg}^{2+}} = 2,0 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c_{\text{ThDP}} = 1,0 \text{ mmol dm}^{-3}$; mjerenje aktivnosti: 50 mmol dm^{-3} fosfatni pufer pH 8.0, $V_r = 0,1 \text{ cm}^3$, $30 \text{ }^\circ\text{C}$, $1000 \text{ okr min}^{-1}$, 20% enzima u reaktoru, $c_{2,3 \text{ CHD}} = 9,97 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c_{\alpha\text{-ketoglutarat}} = 10,17 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c_{\text{Mg}^{2+}} = 2,0 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c_{\text{ThDP}} = 0,5 \text{ mmol dm}^{-3}$).

Slika 5.11. prikazuje aktivnost enzima pri koncentraciji akrilonitrila od $1000 \text{ mmol dm}^{-3}$. Aktivnost enzima opada tijekom vremena i nakon 7 sati relativna aktivnost pada na nulu. Razlog ovako naglog pada je velika koncentracija supstrata.



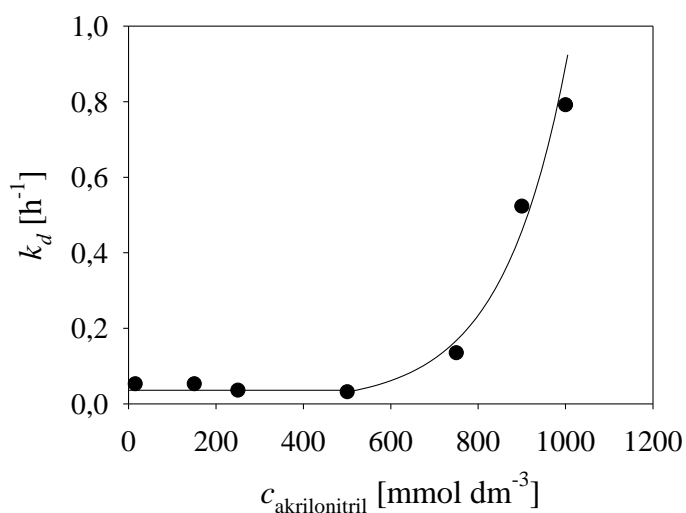
Slika 5.11. Aktivnost enzima u reakcijskoj smjesi pri koncentraciji akrilonitrila od $1000 \text{ mmol dm}^{-3}$ (50 mmol dm^{-3} fosfatni pufer pH 8.0, $V_r = 1 \text{ cm}^3$, $30 \text{ }^\circ\text{C}$, $1000 \text{ okr min}^{-1}$, 50% enzim u reaktoru, $c_{\text{akrilonitril}} = 1000 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c_{\text{Mg}^{2+}} = 2,0 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c_{\text{ThDP}} = 1,0 \text{ mmol dm}^{-3}$; mjerenje aktivnosti: 50 mmol dm^{-3} fosfatni pufer pH 8.0, $V_r = 0,1 \text{ cm}^3$, $30 \text{ }^\circ\text{C}$, $1000 \text{ okr min}^{-1}$, 20% enzim u reaktoru, $c_{2,3 \text{ CHD}} = 9,97 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c_{\alpha\text{-ketoglutarat}} = 10,17 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c_{\text{Mg}^{2+}} = 2,0 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c_{\text{ThDP}} = 0,5 \text{ mmol dm}^{-3}$).

Rezultati (slika 5.5. – 5.11.) pokazuju da povećanjem koncentracije akrilonitrila tijekom inkubacije dolazi do ubrzanog pada aktivnosti enzima, koji se može kvantificirati konstantama deaktivacije prvog reda. Matematički model (jednadžbe 4.1.- 4.6.) je dobro opisao dobivene eksperimentalne podatke. Procijenjene konstante deaktivacije enzima su prikazane tablica 5.3. Vidljivo je da su pri najnižim koncentracijama supstrata od 15 do 500 mmol dm^{-3} vrijednosti konstanti deaktivacije relativno niske i približno jednake. Pri najvišim koncentracijama supstrata, vrijednosti konstanti deaktivacije su najviše. Što je veća konstanta deaktivacije, aktivnost enzima brže pada.

Tablica 5.3. Konstante deaktivacije enzima pri različitim koncentracijama akrilonitrila.

$c_{\text{akrilonitril}} [\text{mmol dm}^{-3}]$	$k_d [\text{h}^{-1}]$
15	0,0528
150	0,0530
250	0,0359
500	0,0316
750	0,1350
900	0,5235
1000	0,7919

Slika 5.12. prikazuje ovisnost konstante deaktivacije o koncentraciji akrilonitrila. S grafa je vidljivo da je do koncentracije akrilonitrila od 500 mmol dm⁻³ konstanta deaktivacije gotovo konstantna, a nakon toga naglo raste do koncentracije od 1000 mmol dm⁻³. Eksponencijalna jednačba $k_d = 0.0011e^{0.0067 \cdot c_{AN}}$ uz $R^2 = 0.989$ je korištena da bi se opisala ovisnost konstante deaktivacije o koncentraciji akrilonitrila za koncentracije veće od 500 mM.



Slika 5.12. Ovisnost konstante deaktivacije enzima MenD o koncentraciji akrilonitrila (50 mmol dm⁻³ fosfatni pufer pH 8.0, $V_r = 1 \text{ cm}^3$, 30 °C, 1000 okr min⁻¹, 50% enzima u reaktoru, $c_{\text{Mg}^{2+}} = 2,0 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c_{\text{ThDP}} = 1,00 \text{ mmol dm}^{-3}$).

6. Zaključak

Provedbom enzimske reakcije katalizirane enzimom sintaza 2-sukcinil-5-enolpiruvil-6-hidroksi-3-cikloheksen-1-karboksilna kiselina (MenD) s α -ketoglutaratom kao donorskim supstratom i akrilonitrilom kao akceptorskim supstratom nastaje 6-cijano-4-ketoheksan kiselina. Tijekom reakcije pada aktivnost enzima. Koncentracija produkta dobivena na kraju reakcije je uvijek nešto manja od početne koncentracije mjerodavnog reaktanta – akrilonitrila zbog polimerizacije akrilonitrila tijekom reakcije. Akrilonitril je u reakciji potrošen u cijelosti.

Ponovljivim eksperimentum u kotlastom reaktoru dokazano je da je enzim dovoljno aktivan kroz dulji vremenski period. Također se može zaključiti da u reakciji ne dolazi do inhibicije produktom, jer se tijekom ovog eksperimenta on akumulira u reaktoru.

Rezultati ispitivanja utjecaja koncentracije akrilonitrila tijekom inkubacije pokazuju da povećanjem koncentracije akrilonitrila tijekom inkubacije s enzimom, dolazi do veće brzine pada aktivnosti enzima, odnosno povećava se konstanta deaktivacije. Iz toga se može zaključiti da visoke koncentracije akrilonitrila nepovoljno djeluju na aktivnost enzima i provedbu same reakcije te bi reakciju trebalo provoditi pri nižim koncentracijama akrilonitrila do 200 mmol dm^{-3} .

Matematički model dobro je opisao dobivene eksperimentalne podatke.

7. Literatura

1. Wohlgemuth, R., Biocatalysis – key to sustainable industrial chemistry, *Current Opinion in Biotechnology*, **21** (2010) 713-714
2. Ringbourn, R.H., Woodley, J., The application of reaction engineering to biocatalysis, *Reaction Chemistry & Engineering*, **1** (2016) 10-11
3. Hranueli, F., Jakobović, Z., Podlesnik, V., Viličić, F., *Tehnička enciklopedija* 5. dio, Zagreb, (1976) 334-345
4. Stryer, L., *Biokemija*, Školska knjiga, Zagreb, 1991., str. 90-95
5. Plainkum, P., Fuchs, S.M., Creation of zymogen, *Nature Structural & Molecular Biology*, **10** (2003) 2-6
6. Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L., *Biochemistry* 5th edition, New York: W.H. Freeman, New York, 2002, str. 187-188
7. Loughlin, W.A., Biotransformations in organic synthesis, *Bioresource Technology*, **74** (2000) 50-55
8. Torres, S., Castro, G.R., Non – Aqueous biocatalysis in homogeneous solvent systems, *Food Technology and Biotechnology*, **42** (2004) 271-277
9. Mahrwald, R., Biocatalysis and Natural Product Synthesis, *Modern Aldol Reactions*, (2004) 201-206
10. Findrik Blažević, Z., *Bioreakcijska tehnika I.*, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, (2013) 3-20
11. Karlson, P., *Biokemija za studente kemije i medicine*, Školska knjiga, Zagreb, 1993., str. 64-70
12. Murphy, K.P., Protein structure, stability, and folding, *Technical Brief*, **8** (2009) 148-149
13. Eijsink, V.G.H., Gaaseidnes, S., Borchert, T.V., Direct evolution of enzyme stability, *Biomolecular Engineering*, **22** (2005) 21-30
14. Vrsalović Presečki, A., *Bioreakcijska tehnika II.*, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, (2013) 1-61
15. Pine, S.H., Hendrickson, J.B., Cram, D.J., Hammolond, G.S., *Organska kemija*, Školska knjiga, Zagreb, 1984., str. 785-825
16. Drago, G.A., Gibbson, T.D., Enzyme stability and stabilisation: application and case studies, *Engineering and Manufacturing for Biotechnology*, Kluwer Academic Publishers, (2001) str. 361-362.

17. NIIR Bord of Consultants & Engineers, Enzymes Biotechnology Handbook, Asia pacific business press, Delhi, 2004, str. 111-113
18. Gunsalus, I.C., Extraction of enzymes from Microorganisms, Methods in Enzymology, **1** (1995) 51-54
19. Hopkins, T.R., Physical and chemical cell disruption for the recovery of intracellular proteins, Bioprocess Technology, **12** (1991) 57-63
20. Fang, M., Macova, A., Hanson, K.L., Kos, I., Palmer, D.R.J., Using substrate analogues to probe the kinetic mechanism and active site of *Escherichia coli* MenD, Biochemistry, **50** (2011) 8712-8714
21. Lešnjak, D., Enzimatska sinteza 6-cijano-4-ketoheksanske kiseline, diplomski rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, 2016.
22. Dawson, A., Fyfe, P.K., Hunter, W.N., Specificity and relativity in menaquinone biosynthesis: the structure of *Escherichia coli* MenD (2-succinyl-5-enolpyruvyl-6-hydroxy-3-cyclohexadiene-1-carboxylate synthase), Journal of Molecular Biology, **384** (2008) 1355-1360
23. Jigis, E.N.M., Bashiri, G., Bulloch, E.M.M., Structural views along the mycobacterium tuberculosis MenD reaction pathway illuminate key aspects of thiamine diphosphate-dependent enzyme mechanism, Structure, **24** (2016) 1-11
24. Beigi, M., Loschonsky, S., Lehwald, P., α -Hydroxy- β -keto acid rearrangement-decarboxylation: impact on thiamine diphosphate-dependent enzymatic transformations, Organic & Biomolecular Chemistry, **11** (2013), 252-256
25. Fesko K., Gruber-Khadjawi M., Biocatalytic methods for C-C bond formation, ChemCatChem, **0** (2013) 11-12
26. Beigi, M., Waltzer, S., Zarei, M., Muller, M., New Stetter reactions catalyzed by Thiamine Diphosphate Dependent MenD from *E. coli*, Journal of Biotechnology, **12** (2014) 1-5
27. Song, H., Dong, C., Qin, M., A thiamine-dependent enzyme utilizes an active tetrahedral intermediate in vitamin K biosynthesis, Journal of the American Chemical Society, **138** (2016) 7244-7247
28. Cleland, W., Derivation of rate equations for multisite ping-pong mechanisms with ping-pong reactions at one or more sites, The Journal of Biological Chemistry, **248** (1973) 8353-8355
29. Chang, R., Physical chemistry for the biosciences, University Science Books, Sausalito (CA), 2005, str. 372-377

30. Reginald, G., Grisham, C.M., Biochemistry, Cengage Learning, Brooks (CA), 2010, str. 406-407
31. Van't Riet, K., Tramper, J., Basic bioreactor design, Marcel Dekker Inc., Basel, 1992, str. 73-76
32. Segel, I.H., Enzyme kinetics, A Wiley-interscience publication, Davis, 1975, str. 18-30
33. Bowden, A.C., Principles of enzyme kinetics, Butterworths, Oxford, 1976, str. 14-20

8. POPIS SIMBOLA I OZNAKA

$t_{1/2}$ - vrijeme poluraspada enzima [h]

t - vrijeme reakcije [min ili s]

k_d – konstanta deaktivacije enzima [min^{-1}]

V_m – maksimalna brzina reakcije [$\text{mmol dm}^{-3} \text{min}^{-1}$]

K_m – Michaelisova konstanta [mmol dm^{-3}]

K_i – konstanta inhibicije [mmol dm^{-3}]

c – molarna koncentracija [mmol dm^{-3}]

$V.A$ – volumna aktivnost enzima [U/cm^3]

$S.A.$ – specifična aktivnost enzima [U/mg]

v_0 – početna brzina nastajanja produkta

k, k_1, k_{-1}, k_2 – konstante brzine reakcije [min^{-1}]

V_r – volumen reaktora [cm^3]

V_{enzim} – volumen otopine enzima [cm^3]

γ – masena koncentracija [mg cm^{-3}]

r – reakcijska brzina [$\text{mol dm}^{-3} \text{h}^{-1}$]

r_1 - reakcijska brzina [$\text{mol dm}^{-3} \text{h}^{-1}$]

ABS – apsorbancija [-]

P – površina [-]

MenD – 2-sukcinil-5-enolpiruvil-6-hidroksi-3-cikloheksen-1-karboksilne kiseline

ThDP – tiamin difosfat

SHCHC - 2-sukcinil-6-hidroksi-2,4-cikloheksadien-1-karboksilat

HPLC – kromatografija visokog učinka

PTFE – politetrafluoretilen

TFA – trifluoroctena kiselina

Mg^{2+} -magnezijev ion

A, B – supstrati

E – enzim

E* - modificirani oblik enzima

ES – enzim-supstrat kompleks

E₀ – ukupna koncentracija enzima

P - produkt u ping-pong reakcijskom mehanizmu

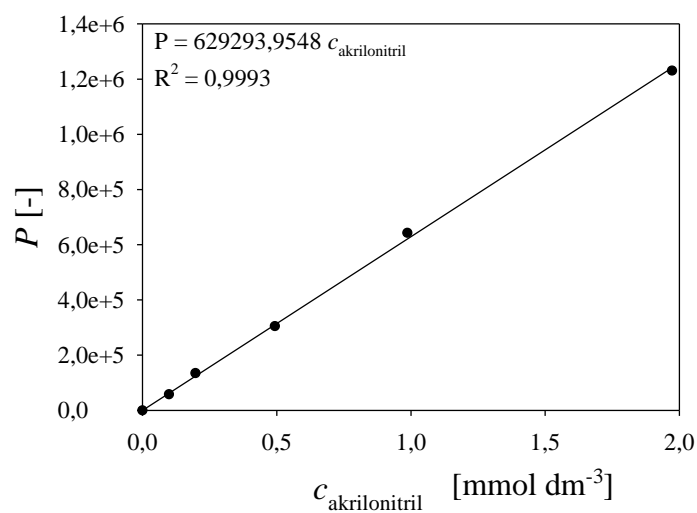
Q – produkt u ping-pong reakcijskom mehanizmu

AN – akrilonitril

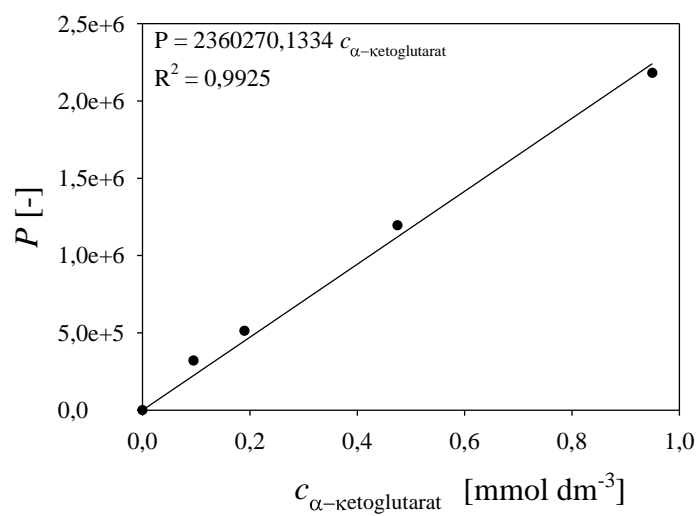
αKG – α – ketoglutarat

2,3 CHD – (2S, 3S)-2,3-dihidroksi-2,3,dihidrobenzoat

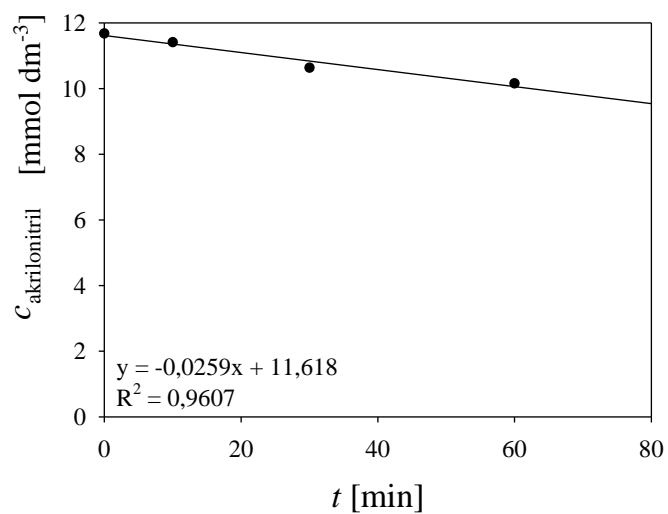
9. Prilozi



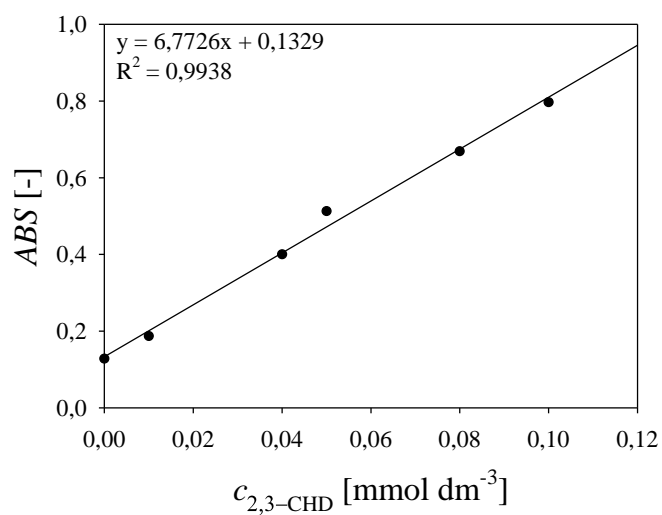
Prilog 1. Baždarni pravac za akrilonitril na HPLC-u uz korištenje izokratne metode na Hypersil koloni.



Prilog 2. Baždarni pravac za α -ketoglutarat na HPLC-u uz korištenje izokratne metode na Hypersil koloni.



Prilog 3. Primjer određivanja nagiba pravca za izračun volumne i specifične aktivnosti enzima.



Prilog 4. Baždarni pravac za 2,3-CHD.

PRILOG 5. Matematički model u programskom paketu Scientist.

```
MicroMath Scientist Model File
IndVars:T
DepVars:cKG,cP,cAN
Params:Vm,KmKG,KmAN,KmThDP,KmMg,KiMg

r=(k*f*γMenD*cKG/KmKG+cKG)*cAN
f=cThDP*cMg/((KmThDP+cThDP)*(KmMg+cMg+(cMg*cMg/KiMg)))
r1=k*cAN
cKG'=-r
cAN'=-r-r1
cP'=r
t=0
cP=0
cKG=240
cAKN=127.15
cMg=1.99
cThDP=0.99
γMenD=0.05
KmKG=0.04609
KmAKN=18734.35
KmThDP=0.00994
KmMg=0.01505
k=1
***
```

ŽIVOTOPIS

Pohađala je opću gimnaziju u Novskoj od 2008. do 2011. Nakon toga upisuje Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, studij ekoinženjerstvo. 2015. godine stječe naziv prvostupnica inženjerka ekoinženjerstva i iste godine nastavlja diplomski studij na istom studiju. Osim toga 2016. godine upisuje i Učiteljski fakultet u Zagrebu, a 2017. godine stječe potvrdu o položenim pedagoško – psihološkim kompetencijama.

Tijekom studija sudjelovala je na XI. Susretu mladih kemijskih inženjera s radom Identifikacija polimernih ambalažnih materijala FTIR spektroskopijom, te dobila dodatna 2 ECTS boda. Osim toga, pohađala je tečaj njemačkog jezika u školi stranih jezika Studentski centar, te je položila razinu B1.